

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEIST
Internationales Bü

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLIC
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

WO 9607730A2



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 5/00, 5/06		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/07730 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. März 1996 (14.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH95/00191 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. September 1995 (05.09.95)		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 2763/94-9 9. September 1994 (09.09.94) CH		(71)(72) Anmelder und Erfinder: RENNER, Wolfgang, A. [CH/CH]; Im Marcoup 2, CH-3286 Muntelier (CH). EPPENBERGER, Hans, M. [CH/CH]; Wiesenweg 5, CH-8116 Würenlos (CH). BAILEY, James, Edwin [US/CH]; Winkelwiese 6, CH-8001 Zürich (CH).	
(74) Gemeinsamer Vertreter: BAILEY, James, Edwin; Institut für Biotechnologie, ETH Zürich, CH-8093 Zürich (CH).			

(54) Title: CHEMICAL PROCESS FOR PROMOTING THE PROLIFERATION OF ANIMAL CELLS

(54) Bezeichnung: CHEMISCHES VERFAHREN ZUR FÖRDERUNG DER PROLIFERATION VON TIERISCHEN ZELLEN

(57) Abstract

The invention relates to means and a process for the serumless and proteinless proliferation of animal cells in cell cultures and the use of suramine-like compounds, especially suramine, as an additive for serumless and proteinless culture media.

(57) Zusammenfassung

Es werden Mittel und Verfahren zur serum- und proteinfreien Proliferation von Tierzellen in Zellkulturen sowie die Verwendung von suraminähnlichen Verbindungen, insbesondere Suramin als Zusatz zu serum- und proteinfreien Kulturmedien beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NB	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Chemisches Verfahren zur Förderung der
Proliferation von tierischen Zellen**

Die Erfindung betrifft Zellkulturen, insbe-

5 sonders Tierzellkulturen, die aufgrund chemischer Mass-
nahmen in serum- und insbesonders serum- und proteinfrei-
er Umgebung wachsen und sich vermehren können, sowie Me-
diumzusätze, welche es Tierzellen erlauben in protein-
und serumfreier Umgebung zu wachsen und sich zu vermehren.

10 Ebenfalls betrifft die Erfindung tierische Zellkulturen,
welche die Fähigkeit besitzen in Suspension zu wachsen
und sich zu vermehren sowie Mediumzusätze, welche die
obgenannten Eigenschaften vermitteln sowie Mediumszusät-
ze, welche die Zell-Zelladhäsion blockieren und auf diese

15 Weise die Aggregatbildung von Tierzellen in Suspensions-
kultur verhindern.

Kulturen genetisch veränderter Säugetierzellen werden zur Herstellung von pharmazeutischen Substanzen verwendet. Sie besitzen im Unterschied zu Mikroorganismen die Fähigkeit, posttranslational modifizierte und richtig gefaltete Proteine herzustellen. Zum Wachstum benötigen Säugetierzellen nebst der im Grundmedium enthaltenen niedermolekularen Substanzen, Wachstumsfaktoren oder Hormone, die üblicherweise durch Zusatz von fötalen Blutseren beigegeben werden. Die Verwendung dieser Blutseren bringt allerdings etliche schwerwiegende Probleme mit sich, sie stellen die grösste Gefahr von Kontamina-
tionen des Produktionsprozesses mit Viren, Mycoplasmen und Prionen (Erreger der spongiformen Enzephalitis (BSE)) dar. Während Viren und Mycoplasmen durch leichtes Erhitzen zerstört bzw. durch Filtration entfernt werden kön-
nen, ist dies bei Prionen wie dem BSE-Erreger nicht mög-
lich, ohne dabei die wichtigen Peptid-Wachstumsfaktoren zu zerstören. Als weitere gravierende Nachteile des Ge-
brauchs von fötalen Seren sind die wesentliche Erschwe-
zung der Produktreinigung durch den hohen Fremdprotein-
gehalt (über 90 %) sowie die hohen Kosten zu erwähnen. Es

wird befürchtet, dass die im Serum enthaltenen Proteine zu allergischen Reaktionen bei Patienten führen können, wenn sie noch in Spuren im Endprodukt vorhanden sind. Zudem muss beim Gebrauch von Serum mit variierender Qualität gerechnet werden. Alter, Gesundheitszustand und Nahrung der Tiere können die Qualität des Serums stark beeinflussen. Dazu kommt, dass die Zusammensetzung des Serums wegen seiner Komplexität im wesentlichen unbekannt ist, was eine exakte Prozesskontrolle verunmöglicht.

10 Selbstverständlich sprechen auch tierschützerische Aspekte gegen die Verwendung von fötalen Seren, werden doch grosse Mengen in einem Produktionsprozess verwendet (üblich sind Kulturmedien mit bis zu 10 % fötalem Kälberseum).

15 Wachstumsfaktoren regulieren das Wachstum und die Differenzierung von tierischen Zellen. Sie werden von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt und induzieren damit ein intrazelluläres Signal, das zur DNA-Synthese sowie letztendlich zur Teilung der Zelle

20 führt (Chao, M. V. Cell 68, 995-7 (1992)). Nebst den aktivierenden Wachstumsfaktoren gibt es auch solche, welche das Wachstum von tierischen Zellen inhibieren. Diese Faktoren spielen als Antagonisten eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Wachstums im gesamten Organismus. C. Gandor, Diss. ETH Nr. 10087 zeigte, dass gewisse Zellen in Kultur über einen autokrinen Stimulationsmechanismus zum Wachstum angeregt werden. Dabei wurde das Augenmerk auf positiv wirkende Faktoren gelegt.

25 Es wurde gezeigt, dass CHO-Zellen durch Mutation mit Ethylmethansulfonat an eine serumfreie Umgebung angepasst werden können und es sind auch Protokolle bekannt, welche die spontane Mutation ausnutzen, um nach monatelanger Selektion eine serumfrei wachsende Zelllinie zu erhalten (C. Gandor, Diss. ETH Nr. 10087). Diese Methoden haben den Nachteil, dass sich die Zelle in beiden Fällen durch Mutationen in unbekannter Weise ändert. Soll beispielsweise ein bestehender Produktionsprozess auf se-

rumfreies Medium umgestellt werden, ist keineswegs sichergestellt, dass bei dem mehrere Monate dauernden Prozess die erwünschten Eigenschaften der Produzentenzelle erhalten bleiben. Mutationen im Produktgen oder in 5 einem Gen, das das Produkt posttranslational modifiziert, könnten verheerende Folgen haben.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch die Ueberexpression von zellzyklusregulatorischen Proteinen (Cycline, Transkriptionsfaktoren) das Wachstum 10 in serum- und proteinfreier Umgebung sowie in Suspension ermöglicht wird (Bailey; Vortrag, "Cell Culture Engineering", San Diego, 8.3.1994). Dabei wurde in den aktivierenden Teil der Wachstumsregulation eingegriffen, was zur Proliferation der Zellen führte. Vorteil dieser 15 Methode ist, dass durch dieses genau definierte Verfahren innert kurzer Zeit eine protein- und serumfrei wachsende Zelllinie erhalten wird.

Viele Zellen benötigen zum Wachstum und zur Vermehrung nebst Wachstumsfaktoren eine Oberfläche auf 20 der sie adhärieren können. Diese muss dazu speziell beschichtet sein. Beim Scale up eines biotechnologischen Prozesses stellt diese Oberflächenabhängigkeit ein grosses Problem dar. Roller bottles, an denen die Zellen adhärieren, eignen sich nicht zur Massstabsvergrösserung, 25 üblicherweise werden die Zellen zur Produktion in grossvolumigen Reaktoren auf Microcarriern gezüchtet. Im Kubikmetermassstab stellt die Verwendung solcher Microcarrier einen wesentlichen Kostenfaktor dar, völlig suspendiertes Wachstum ist daher von grossem Vorteil. Auch 30 ist die unvermeidliche Inhomogenität der Suspension bei der Verwendung von Microcarriern problematisch. Einige Zelltypen zeigen als Reaktion auf den Entzug von entsprechenden Oberflächen starke Aggregatbildung. Dabei sterben durch die fehlende Vaskualisierung die im Inneren eines 35 Aggregates liegenden Zellen ab; der Anteil lebender Zellen in einer solchen Kultur ist entsprechend gering. Offenbar existieren mehrere Mechanismen, die zur Aggregat-

bildung führen können. Es konnte gezeigt werden, dass die aus toten Zellen austretende chromosomale DNA Nachbarzellen verklebt und so zur Ausbildung grosser Aggregate führen kann (W. Renner et al., Biotechnology and Bioengineering 41, 188-193 (1993)). Durch Zugabe von DNase wird diese Art der Verklumpung verhindert resp. rückgängig gemacht. Offensichtlich existieren auch Arten der Verklumpung, die auf anderen Mechanismen beruhen. Diese Aggregate entstehen auch ohne das Vorhandensein toter Zellen, es handelt sich dabei um einen Adhäsionsvorgang der Zellen aufeinander. Während die erstgenannte Art der Aggregatbildung durch eine schonende Züchtung (mit entsprechend geringem Anteil toter Zellen) verhindert werden kann, bedarf es zur Verhinderung der zweitgenannten Art der Aggregation einer aktiven Blockierung der entsprechenden biologischen Abläufe.

Obwohl tierische Zellen zur Produktion von bereits kommerziell vertriebenen pharmazeutischen Wirkstoffen verwendet werden, stellt die Verwendung von fötalen Blutseren als Zusatz im Kulturmedium ein in jeder Hinsicht unbefriedigendes System dar. Die hohe Gefahr von Kontaminationen (Viren, Mycoplasmen, Prionen sowie allergen wirkende Serumproteine), die Erschwerung der Produktereinigung, variierende Qualität des Serums, die hohen Kosten sowie ethische und tierschützerische Aspekte sprechen klar gegen eine weitere Verwendung dieser Mediumzusätze. Die durch die Oberflächengebundenheit der Zellen auftretenden Probleme in biotechnologischen Prozessen können zwar durch den Einsatz von Microcarriern gelöst werden, die hohen Kosten der Carrier beeinflussen die Wirtschaftlichkeit des Prozesses jedoch enorm.

Es besteht deshalb ein Bedürfnis für ein serum- und proteinfreies Wachstumsmedium, in dem Zellen ohne spezielle Mutagenese oder gentechnologische Veränderung proliferieren können. Die Bereitstellung eines Mediums, welches tierischen Zellen durch extrazelluläre Mass-

nahmen suspendiertes Wachstum ermöglicht, war Aufgabe der vorliegenden Erfindung.

Es ist bekannt, dass Suramin Natrium die Bindung von verschiedenen Wachstumsfaktoren an den entsprechenden Rezeptoren hemmt, wodurch auch die Proliferation dieser Zellen gehemmt wird. Voogd, T.E. et al. Pharmacological Reviews, 45, 177-203 (1993). Unter den Wachstumsfaktoren, bei welchen der erwähnte Effekt von Suramin Natrium beschrieben wurde, waren unter anderem bFGF, IGF I und II, PDGF, TGF beta etc. Selbst der mitogene Effekt von fötalem Kälberserum konnte auf diese Art unterdrückt werden. Die Vielfalt der Effekte von Suramin Natrium in bezug auf Wachstumsfaktorregulation lässt auf einen eher generellen Mechanismus schliessen. Die favorisierte Hypothese geht von einer Maskierung des Wachstumsfaktors mit Suramin Natrium aus. In all den bisher beschriebenen Fällen hatte Suramin Natrium eine wachstumsinhibierende Wirkung, es wurde daher schon versuchsweise als Chemotherapeutikum gegen Krebs eingesetzt.

Ueberraschenderweise konnte nun gezeigt werden, dass tierischen Zellen durch Zugabe von suraminähnlichen Verbindungen, insbesonders Suraminsalzen wie Suramin Natrium, zum Kulturmedium suspendiertes Wachstum in serum- und/oder proteinfreier Umgebung ermöglicht werden kann. Unter suraminähnlichen Verbindungen sind Stoffe zu verstehen, die mindestens teilweise die räumliche Struktur des Suramins aufweisen, z.B. die Symmetrie, die ionische Gruppen wie Sulfono- oder Phosphonogruppen, sowie aromatische Funktionen enthalten, insbesonders zumindest teilweise wasserlösliche Salze eines sulfonierten, gegebenenfalls alkylsubstituierten aromatischen Oligoamidharnstoffs der allgemeinen Formel I



Ar = unabhängig voneinander Phenyl oder
5 Naphthyl ist,

R = unabhängig voneinander Wasserstoff oder
eine niedere Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-
Atomen bedeutet,

R' = $-SO_3Y$ ist, wobei

10 Y = unabhängig voneinander ein Aequivalent
eines Kations ist, insbesonders Na, K,
Li

X = unabhängig voneinander $-NH-C(=O)-$ oder,
15 $-NH-C(=O)-NH-$ bedeuten,

n und m unabhängig voneinander ganze Zahlen
von 0 bis 7 bedeuten, deren Summe pro
Ar nicht grösser als 7 ist und wobei
20 pro Gesamt molekül mindestens ein Sub-
stituent R' vorhanden sein muss, und
p = 1 bis 20 ist.

Bevorzugte Oligoamidharnstoffe sind in den
abhängigen Ansprüchen 3 bis 6 beschrieben.

25 Durch Zugabe von z.B. Suramin Natrium zum
Nährmedium lassen sich Zelllinien, welche zuvor serum-,
protein- und/oder oberflächenabhängig gewachsen sind,
serum- und proteinfrei sowie als Einzelzellsuspension mit
sehr geringer Aggregatbildung züchten. Erfundungsgemäss
30 gezüchtete Zellkulturen sind in den Bildern und Figuren
veranschaulicht.

Bild 1 zeigt CHO K1 Zellen 4 Tage nach Trans-
fer in unsupplementiertes FMX 8 Medium,

35 Bild 2 zeigt CHO K1 Zellen 4 Tage nach Trans-
fer in FMX 8 Medium supplementiert mit 0,5 mg/ml Suramin
Natrium,

Figur 3 zeigt das Wachstum von CHO K1 Zellen
in Spinnerkultur,

Figur 4 zeigt das Wachstum von CHO K1:cycE Zellen im COLOR Bioreaktor,

Figur 5 zeigt das Wachstum von tPA produzierenden CHO Zellen (CHO 1-15500; ATCC Nr. CRL 9606),

5 Bild 6 zeigt die Morphologie von BHK 21 Zellen in Adhärenzkultur in unsupplementiertem FMX 8 Medium,

Bild 7 zeigt die Morphologie von BHK 21 Zellen in Suspensionskultur in unsupplementiertem FMX 8 Medium,

10 Bild 8 zeigt die Morphologie von BHK 21 Zellen in FMX 8 Medium supplementiert mit 1 mg/ml Suramin Natrium,

15 Figur 9 zeigt das UV-Differenzspektrum einer 1 mg/ml BSA Lösung, welcher 99,9 % des Suramin Natrium (0,5 mg/ml) durch Ultrafiltration in 1 M NaCl Lösung entzogen wurden gegen eine reine BSA Lösung, und

20 Figur 10 zeigt das UV-Differenzspektrum einer 1 mg/ml BSA Lösung, welche 1/1000 der Mediumskonzentration von Suramin Natrium (0,5 µg/ml) enthält gegen eine reine BSA Lösung.

Es wurde bereits früher beobachtet, dass sich CHO Zellen nach dem Transferieren in ein neues Kulturgefäß ein bis zweimal teilen und erst dann in einen ruhenden Zustand übergehen. Es ist möglich, dass dies mit der 25 Produktion von Faktoren zusammenhängt, die die Polifération inhibieren und dass solche inhibierend wirkenden Faktoren beim Zusatz von fötalen Blutseren durch die in hoher Konzentration vorhandenen aktivierenden Faktoren kompensiert oder überspielt werden. Offenbar wird eine gewisse Zeit für die Produktion resp. Demaskierung der 30 die Proliferation hindernden Faktoren, beispielsweise inhibierende Faktoren, benötigt, um eine aktive Schwellenkonzentration zu erreichen. Durch Zugabe von Suramin Natrium resp. diesem ähnlichen Verbindungen ist es nun 35 möglich, serum- und proteinfrei wachsende CHO Zellen ohne Adaptationsphase in einem völlig serum- und proteinfreien Medium (z.B. dem FMX-8 Medium der Firma Messi Cell

Culture Technologies, Zürich) zu züchten. Es wird angenommen, dass die Wirkung der suraminähnlichen Substanzen primär extrazellulär ist, intrazelluläre Wirkungen sind als unwahrscheinlich einzustufen. Die sechs Sulfonatgruppen des Suramins selbst lassen einen Durchgang durch die Zellmembran als unwahrscheinlich erscheinen.

Die Wachstumsraten in suraminhaltigem Medium variieren leicht von Zelllinie zu Zelllinie etwa in dem Masse, wie dies schon in der serumhaltigen ursprünglichen 10 Kultur der Fall ist. Wöchentliche Verdünnungsraten im serum- und proteinfreien FMX-8 Medium liegen im Bereich von 1/25 bis 1/250 und sind somit sehr geeignet für den Einsatz in einem Produktionsprozess. Diese günstigen Effekte konnten bei mehreren Produktionszelllinien beobachtet werden, so z.B. bei CHO Produzentenzellen für tPA oder der 15 ursprünglichen CHO K1 und DUKX Zelllinien.

Suramin Natrium hatte selbst im Fall von bereits serum- und proteinfrei wachsenden CHO Zellen eine überaus positive Wirkung. Diese Zellen waren vorgängig 20 mit einem Expressionsvektor für Cyclin E transfiziert worden. Nach Zugabe von Suramin Natrium konnte schnelleres Wachstum, ein höherer Lebendzellanteil sowie eine deutlich höhere Endzellkonzentration beobachtet werden. Offensichtlich ist bei diesen Zellen weiterhin ein extra- 25 zellulärer Inhibitionsmechanismus aktiv, welcher durch Suramin unterdrückt wird.

Baby Hamster Kidney Zellen (BHK 21) werden ebenfalls zur Produktion von pharmazeutisch wirksamen Substanzen eingesetzt. Dabei werden Medien verwendet, 30 welche entweder fötales Kälberserum als Zusatz enthalten oder Wachstumsfaktoren und Proteine wie Transferrin und Insulin. Ueberraschenderweise ist es den Erfindern gelungen BHK 21 Zellen in einem ursprünglich für CHO Zellen entwickelten Medium zu züchten (FMX 8 Medium der Firma 35 Messi Cell Culture Technologies Zürich, F. Messi, Diss. ETH Nr. 9559(1991)). Dabei wurde ein sehr schnelles Wachstum und ein hoher Lebendzellanteil beobachtet.

Wöchentliche Verdünnungsraten von 1/100 konnten über mindestens drei Monate lang aufrecht erhalten werden. Die Morphologie der Zellen war dabei, wie in Bild 6 zu erkennen, ausgebreitet und adhärent.

5 BHK 21 Zellen können jedoch alternativ auch als suspendierte Einzelzellkultur gezüchtet werden mit extrem geringer Aggregatbildung. Dabei ist ein weiterer positiver wie überraschender Effekt von Suramin Natrium, dass es Zell-Zell und Zell-Substrat Adhäsionsprozesse
10 blockiert. Oberflächengebunden wachsende CHO oder BHK 21 Zellen wachsen nach Zugabe von 0,5 - 1 mg/ml Suramin Natrium zum Kulturmedium in Suspension als Einzelzellkultur. In all den oben beschriebenen Fällen konnte ein vollständiger Uebergang zu abgerundeter Morphologie und
15 suspendiertem Wachstum beobachtet werden (siehe Bild 8).

Baby Hamster Kidney Zellen bilden in Suspensionskultur (z.B. Spinnerkultur) in Medien mit oder ohne Serum und Proteinen sphärische Aggregate aus, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass sich die Zellen aufeinander und auf schon bestehenden Aggregaten ausbreiten (siehe Bild 7). Diese Art der Aggregation unterscheidet sich deutlich von jener der CHO Zellen. Die Adhäsion von BHK 21 Zellen aneinander ist ein aktiver Prozess. Dieser Adhäsionsprozess kann durch Zugabe von Suramin Natrium ins
20 Nährmedium verhindert werden. BHK 21 Zellen wachsen so als Einzelzellsuspension, es kann keine Ausbreitung der Zellen aufeinander beobachtet werden (siehe Bild 8). Damit erhöht sich der Lebendzellanteil von BHK Zellkulturen
25 enorm. Die Nährstoffversorgung ist nicht mehr limitiert
30 wie dies im Inneren von Zellaggregaten der Fall ist. In biotechnologischen Prozessen mit tierischen Zellen ist das vollkommen suspendierte Wachstum ein grosser Vorteil. Die Vermeidung teurer Microcarrier vereinfacht und verbilligt den Prozess enorm. Das Einphasensystem erlaubt
35 zudem eine homogener Prozessführung und -kontrolle.

Suraminähnliche Verbindungen werden dem Zellkulturmedium in Mengen von $8 \cdot 10^{-5}$ bis 10^{-3} molar zuge-

geben, Suramin Natrium vorzugsweise in Mengen von 0,2 - 1 mg/ml. In diesem Konzentrationsbereich werden keinerlei toxische Effekte beobachtet (LD_{50} in Maus = 620 mg/kg Körpergewicht i.v.). Die Verwendung von Suramin Natrium

5 als solches in Zellkulturprozessen ist ebenfalls unbedenklich, da die Substanz selbst als therapeutisches Produkt für Menschen zugelassen ist und somit sämtliche klinischen Tests zur Ermittlung eventueller Toxizität erfolgreich durchlaufen hat.

10 Suramin Natrium ist kommerziell erhältlich und relativ günstig, so dass es, obschon es dem Medium in relativ hoher Menge zugegeben wird, nur einen minimen Kostenfaktor darstellt, der - verglichen mit den Kosten eines Zellkulturprozesses - absolut vernachlässigbar ist.

15 Es wird angenommen, dass die Wirkung von Suramin Natrium durch relativ unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen zustandekommt. Somit muss auch davon ausgegangen werden, dass eine Wechselwirkung zwischen Suramin Natrium und dem gewünschten Endprodukt besteht,

20 eventuell sogar eine Bindung auftritt. Es ist daher von grosser Wichtigkeit, Methoden zur Hand zu haben, mit welchen sich Suramin Natrium aus dem Endprodukt entfernen sowie nachweisen lässt. Eine günstige Methode zur Entfernung ist Ultrafiltration nach der Neutralisierung von

25 ionischen Wechselwirkungen. So konnten in einem Schritt 99.9 % der ursprünglich vorhandenen Menge Suramin Natrium aus einer Proteinlösung entfernt werden. Der Restgehalte entsprach 1 Molekül Suramin Natrium pro 5 Molekülen Rinder Serum Albumin, einem Protein, das wegen seiner hohen

30 Adsorptionsfähigkeit als Modellprotein gewählt wurde. Zum Nachweis von Suramin Natrium wurde in der vorliegenden Arbeit UV Spektroskopie gewählt. Durch die aromatischen Gruppen im Molekül kann ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 310 nm zur Detektion herangezogen werden. Die in Proteinen enthaltenen Aromaten (Phe, Tyr, Trp) absorbieren allesamt bei niedrigeren Wellenlängen.

35

Beispiel 1**Serum- und proteinfreies Wachstum von CHO K1 Zellen**

5 Zum Uebergang von serum- und oberflächenab-
hängigem Wachstum zu serum- und proteinfreiem Wachstum in
Suspension wird keinerlei Adaptations- oder Selektions-
phase benötigt. Die Zellen einer konfluenten T75 Flasche
10 werden durch Trypsinierung (Life Technologies) abgelöst
und zur Inaktivierung des Trypsins in 10 ml einer 1 mg/ml
Soybean Trypsin Inhibitor (Sigma) Lösung in Medium aufge-
nommen. 0,2 ml dieser Zellsuspension werden in 25 ml FMX
8 Medium aufgenommen, welches Suramin Natrium (Bayer AG)
15 in einer Konzentration von 0,5 mg/ml enthält. Dieser
Zellkultur wird nach 4 Tagen 25 ml des gleichen suramin-
haltigen Mediums zugegeben. Nach einer Woche kann die
Kultur durch einfaches Verdünnen 1/50 gesplittet werden.
(1 ml Kultur in 24ml frisches Medium plus refeed nach 4
20 Tagen etc.). Auf diese Weise wurden CHO K1 Zellen während
drei Monaten stabil in Kultur gehalten. CHO K1 Zellen
sind vier Tage nach dem Serumentzug in Medium ohne Sura-
min Natrium auf Bild 1 sowie in Medium mit Suramin Natri-
um auf Bild 2 dargestellt. CHO K1 Zellen wurden zur Be-
25 stimmung der Wachstumsparameter in 0,5 l Spinnerflaschen
(Technomara) in FMX 8 Medium mit 0,5 g/l Suramin Natrium
Zusatz gezüchtet. Wachstumskurven dieser Kultur sind Fi-
gur 3 zu entnehmen. Zelldichten wurden nach Trypanblau-
färbung im Hämatomometer bestimmt. Glukosekonzentrationen
30 wurden mit Hilfe eines YSI Glucoseanalysers bestimmt.

Beispiel 2Serum- und proteinfreies Wachstum von CHO
KlcycE Zellen

5 Suramin Natrium hat ebenfalls einen günstigen Einfluss auf das Wachstum von CHO Zellen, welchen durch andere Methoden das Wachstum in serum- und proteinfreiem Medium ermöglicht wurde. Dazu wurden Vergleichskulturen angesetzt, welche unter sonst identischen Bedingungen in
10 Medien mit resp. ohne Suramin Natrium-Zusatz kultiviert wurden.

Herstellung von K1 cyc E-Zellen

15 Die cDNA des humanen Cyclin E Gens kann durch Standard-Hybridisierungsverfahren aus einer HeLa cDNA-Bank isoliert werden. Sämtliche folgenden Methoden sind Standard Labor Technik und wurden nach Sambrook et al. ausgeführt. HeLa mRNA wurde mit Hilfe eines mRNA Extraktionskits der Firma Pharmacia isoliert. Nach cDNA Synthese und Einbau in den Phagen lambda entsprechend Herstellerangaben (Stratagene) wurde mittels Standard Hybridisierungstechniken die cDNA des humanen Cyclin E Gens isoliert (Sambrook,J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.
20 25 Molecular cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Nach in vivo Excision ("Zappen") der cDNA-Bank entsprechend Herstellerangaben lag die cDNA im Plasmid pBluescript vor. Nach Restriktionsverdau mit Eco RI liess sich ein Fragment mit einer Grösse von 2.5 kb aus einem
30 35 0.8 % low melt-Agarose Gel isolieren. Nach dem Linearisieren des Vektors pRc/CMV (Invitrogen) mit dem Restriktionsenzym Bst XI wurden Fragment und Vektor mit dem Klenowenzym aufgefüllt. Nach Ligation und Transformation in den E.coli Stamm DH5alpha und Identifizierung eines Konstruktes in Sinn-Orientierung wurden grössere Mengen des Expressionsvektors mit dem FlexiPrep Kit (Pharmacia) hergestellt.

CHO K1 Zellen wurden so in eine Kulturschale einer "Six-well-plate" (TPP) eingesät, dass am Tag der Transfektion 50-70 % Konfluenz erreicht wurde. Dabei befanden sich die Zellen in Medium das 10 % fötales Kälber-
5 serum enthält (z.B. Ham's F12, Gibco BRL).

Zur Lipofektion wurden als erstes zwei Schalen einer 24 well-plate jeweils mit 100 µl FMX-8 Medium gefüllt. In eine dieser Schalen wurden 10 µl LipofektAmin (Gibco) und in die andere 1-2 µg DNA des pRC Cyclin E Expressionsvektors gegeben. Nach Mischung der beiden Lösungen wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die CHO K1 Zellen dreimal mit serumfreiem FMX-8 Medium gewaschen. Nach Zugabe von 800 µl Medium zu den 200 µl LipofektAmin/DNA Mischung wurde dieses
10 Reagenz zu den gewaschenen Zellen gegeben. Nach 6h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden weitere 1.5 ml FMX 8 Medium zugegeben.
15

24 h nach Beginn der Lipofektion wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst. Dazu wurde das
20 Medium entfernt, 1 ml Trypsinlösung (Gibco BRL) zugegeben, etwa 1 min bei leichtem Schütteln gewartet, das Trypsin abgesogen und etwa 10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 2 ml FMX 8 Medium aufgenommen, das 1/1000 (w/vol) Trypsininhibitor
25 (Sigma) enthielt.

Die Kulturflaschen wurden während der ersten drei Wochen mit Fibronectin (Boehringer Mannheim) beschichtet (1µg/cm²), um in der Übergangsphase den Zellen die Adhäsion zu erleichtern.
30 1 ml sowie 0.5 ml der abgelösten Zellen wurden nun in 5 ml FMX 8 Medium in T-25 Kulturflaschen aufgenommen und inkubiert. Da die Effizienz der Lipofektion, sowie der Anteil an überlebenden Zellen nach der Lipofektion variieren können, ist es ratsam beim Subkultivieren verschiedene Zellkonzentrationen einzusetzen um
35 das Überleben der Kulturen zu sichern.

Nach einigen Tagen Proliferation, die auf transiente Expression des Cyclin E Gens zurückzuführen ist, wird üblicherweise nach einer Woche ein vorübergehender Rückgang der Proliferation beobachtet, bis die 5 Zellen, die den Vektor stabil eingebaut haben, die Kultur überwachsen haben. Daher muss von Fall zu Fall, die Verdünnungsrate eingestellt werden. Trotzdem ist es ratsam, jede Woche zu subkultivieren, da offenbar Rückstände toter Zellen am Plastik inhibierend wirken.

10 Nach einer Woche wurde die Kultur in eine beschichtete T-75 Flasche transferiert (Verdünnungsrate 1/2 bis 1/5). Nach etwa drei Wochen weiterer Kultivierung mit Verdünnungsraten zwischen 1/2 und 1/20, liessen sich die Zellen mit wöchentlichen Verdünnungsraten von 1/40 in un- 15 beschichteten Kulturflaschen züchten. Diese Zellen können in serum- und proteinfreiem FMX-8 Medium während langer Zeit in Kultur gehalten werden.

20 Einfluss von Suramin Natrium auf das Wachstum von CHO K1 cyc E Zellen

In T-Flaschen zeigt sich der Unterschied durch eine deutlich höhere Endzelldichte sowie durch die grössere wöchentliche Verdünnungsrate von 1/250, mit wel- 25 cher diese Zellen gezüchtet werden können, im Vergleich zu 1/50 ohne Suramin Zusatz.

Figur 4 zeigt die Wachstumsparameter von CHO K1cycE Zellen mit Zusatz von 0,5 mg/ml Suramin Natrium im compact loop Bioreaktor (Bioengineering). Die physikali- 30 schen Parameter wurden wie folgt eingestellt: Arbeitsvo- lumen 2,3 l; Temperatur 37°C, pH 7,3; pO₂ 50% Luftsauer- stoffsättigung; Rührerdrehzahl 580 rpm. Zelldichten wur- den nach Trypanblaufärbung im Hämatomometer gezählt. Glu- kosekonzentrationen wurden mit Hilfe eines YSI Glucose- 35 analysers bestimmt.

Ein Vergleich der Wachstumsparameter von CHO K1 cyc E-Zellen mit und ohne Suramin Natrium Zusatz ist der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle

	ohne Suramin	mit Suramin
Zelldichte pro ml	800'000	2'700'000
Wachstumsrate (pro Tag)	0.8	1.05
5 Verdoppelungszeit (Std.)	21	15.8

Beispiel 3

10 Serum- und proteinfreies Wachstum von tPA produzierenden CHO Zellen (CHO 1-15500; ATCC Nr. CRL-9606)

Der Uebergang dieser Zelllinie in serum- und proteinfreies Medium wird wie unter Beispiel 1 vollzogen.
 15 CHO tPA Zellen werden in FMX 8 Medium mit 0,5 mg/ml Zusatz Suramin Natrium gezüchtet. Die dabei zu erreichenden wöchentlichen Verdünnungsraten liegen ebenfalls bei 1/50. Die Morphologie dieser Zellen änderte sich in selbem Massse wie in Beispiel 1 für CHO K1 Zellen beschrieben. Die
 20 Wachstumsparameter der CHO tPA Zellen sind in Figur 5 dargestellt.

Beispiel 4

25 Serum- und proteinfreies adhärentes Wachstum von BHK 21 Zellen

BHK 21 Zellen können im serum- und proteinfreien FMX 8 Medium der Firma Messi Cell Culture Technologies adhärent gezüchtet werden. Zum Uebergang von serumabhängigem Wachstum zu serum- und proteinfreiem Wachstum in Suspension wird keinerlei Adaptations- oder Selektionsphase benötigt. Die Zellen einer konfluenten T75 Flasche (TTP) werden durch Trypsinisierung abgelöst und
 30 zur Inaktivierung des Trypsins in 10 ml einer 1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor (Sigma) Lösung in Medium aufgenommen. 0,1 ml dieser Zellsuspension werden in 25 ml FMX

8 Medium aufgenommen. Nach 4 Tagen werden 25 ml FMX 8 Medium zugegeben und nach 1 Woche trypsinisiert wie oben beschrieben. BHK 21 Zellen konnten auf diese Weise mindestens drei Monate lang mit wöchentlichen Verdünnungsraten 5 von 1/100 gezüchtet werden. Die Morphologie der Zellen in Adhärenzkultur ist auf Bild 6 abgebildet.

Beispiel 5

10

Einzelzell-Suspensionskulturen von BHK 21 Zellen

BHK 21 Zellen können alternativ auch in Suspension gezüchtet werden. Ohne Zugabe von Suramin Natrium 15 bilden sich in Suspensionskultur sehr grosse Aggregate (siehe Bild 7). Diese entstehen in gerührter (Spinner oder Bioreaktor) wie in ungerührter Suspensionskultur in BSA (Rinder Serum Albumin) beschichteten T-Flaschen. Diese Aggregation wird durch Zugabe von 1 mg/ml Suramin Na- 20 trium zum Kulturmedium gänzlich verhindert. Die Morphologieänderung nach Suramin Zugabe ist in Bild 8 dargestellt. Die Wachstumsparameter einer Spinnerkultur von BHK 21 Zellen in suraminhaltigem Medium sind in Figur 9 dargestellt. Die Eigenschaften dieser Zellkulturen eignen 25 sich besonders für den Einsatz in Produktionsprozessen, besonders hinsichtlich einfacher Handhabung, geringer Einsaatdichten sowie schnellen Wachstums zu hohen Zell- dichten bei gleichzeitiger Verhinderung von Aggregaten.

30

Beispiel 6

Entfernung von Suramin Natrium aus Protein Lösungen

Zur Entfernung von Suramin Natrium aus Protein 35 inlösungen (z.B. Zellkulturüberständen) wurde die Methode der Ultrafiltration gewählt. Als Modellprotein wurde

Rinder Serum Albumin (BSA) gewählt. Dieses Protein zeichnet sich durch seine hohe Adsorptionsfähigkeit aus. Einer 1 mg/ml BSA Lösung wurde Suramin Natrium in Mengen wie sie im Zellkulturmedium vorhanden sind (500 µg/ml) zugegeben. 100 ml dieser Lösung wurde NaCl in einer Konzentration von 1M zugegeben. Diese Lösung wurde durch eine Membran mit einer Porengröße von 10'000 Dalton ultrafiltriert. Das Filtrat wurde in 100 ml einer 1M Kochsalzlösung aufgenommen und filtriert; dieser Vorgang wurde im ganzen dreimal durchgeführt. Das so gereinigte Filtrat wurde in Wasser aufgenommen, so dass eine 1 mg/ml BSA Lösung resultierte. Der Restgehalt an Suramin Natrium wurde mittels UV-Spektroskopie ermittelt. Dabei konnte durch Vergleich mit Referenzspektren von Suramin/BSA Masselösungen eine Restkonzentration von 0,5 µg/ml ermittelt werden (Figuren 9 und 10). Bezogen auf die Anfangskonzentration wurden somit 99,9 % des Suramin Natriums der Proteinlösung entzogen, d.h. nach der Reinigung befand sich pro 5 Moleküle BSA nur ein Molekül Suramin Natrium in der Lösung.

Patentansprüche

1. Serumfreies und insbesonders serum- und
proteinfreies Kulturmedium, dadurch gekennzeichnet, dass
5 es mindestens eine suraminähnliche Verbindung enthält.

2. Kulturmedium, dadurch gekennzeichnet, dass
die suraminähnliche Verbindung ein zumindest teilweise
wasserlösliches Salz eines sulfonierten, gegebenenfalls
Alkyl-substituierten aromatischen Oligoamidharnstoff
10 enthält, der der allgemeinen Formel I



15 entspricht, in der

Ar = unabhängig voneinander Phenyl oder
Naphthyl ist,

20 R = unabhängig voneinander Wasserstoff oder
eine niedere Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-
Atomen bedeutet,

R' = $-SO_3Y$ ist, wobei

Y = unabhängig voneinander ein Aequivalent
eines Kations ist, insbesonders Na, K,
Li

25 X = unabhängig voneinander $-NH-C(=O)-$ oder
 $-NH-C(\overset{O}{\underset{\parallel}{C}})-NH-$ bedeuten,

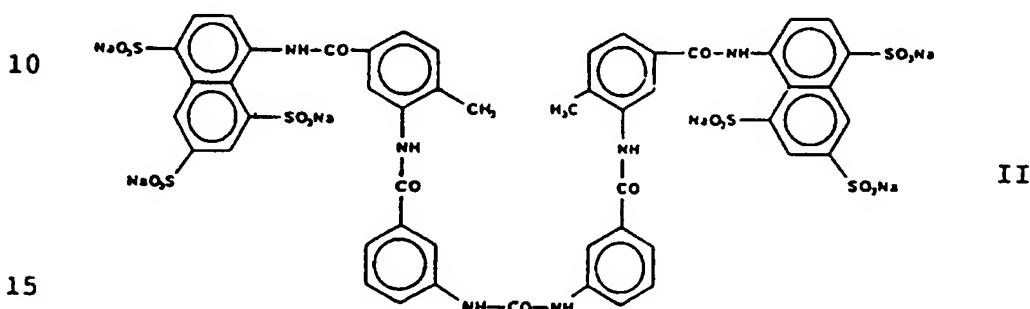
30 n und m unabhängig voneinander ganze Zahlen
von 0 bis 7 bedeuten, deren Summe pro
Ar nicht grösser als 7 ist und wobei im
Gesamt molekül mindestens ein Substitu-
ent R' vorhanden sein muss, und

35 p = 1 bis 20 ist.

3. Kulturmedium gemäss Anspruch 2, dadurch
gekennzeichnet, dass p = 5 ist.

4. Kulturmedium gemäss Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass R unabhängig voneinander -H oder -CH₃ und R' = -SO₃Na und die Summe über alle m im Molekül ≥ 2 ist.

5 5. Kulturmedium gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die suraminähnliche Verbindung die folgende Strukturformel II



besitzt.

6. Kulturmedium gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es eine suramin-ähnliche Verbindung in einer Konzentration von 8·10⁻⁵ bis 10⁻³ molar enthält.

7. Tierzellkultur mit suspendierten, im wesentlichen nicht agglomerierten Tierzellen in einem serumfreien Medium, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium ein Medium gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6 ist.

8. Tierzellkultur gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierzellen Säugetierzellen sind.

9. Tierzellkultur gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierzellen Chinese Hamster Ovary oder Baby Hamster Kidney Zellen sind.

10. Verwendung von suraminähnlichen Verbindungen als Zusatz zu serumfreiem, insbesondere serum- und proteinfreiem Kulturmedium.

11. Verwendung gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die suraminähnliche Verbindung eine Verbindung entsprechend der allgemeinen Formel I gemäss Anspruch 2 enthält.

12. Verwendung gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass $p = 5$ ist.

13. Verwendung gemäss Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass R unabhängig voneinander
5 Wasserstoff oder $-\text{CH}_3$ bedeuten und $\text{R}' = -\text{SO}_3\text{Na}$ und die Summe aller m in Molekül ≥ 2 ist.

14. Verwendung gemäss Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als suraminähnliche Verbindung eine Verbindung der Strukturformel II gemäss Anspruch 5 ver-
10 wendet wird.

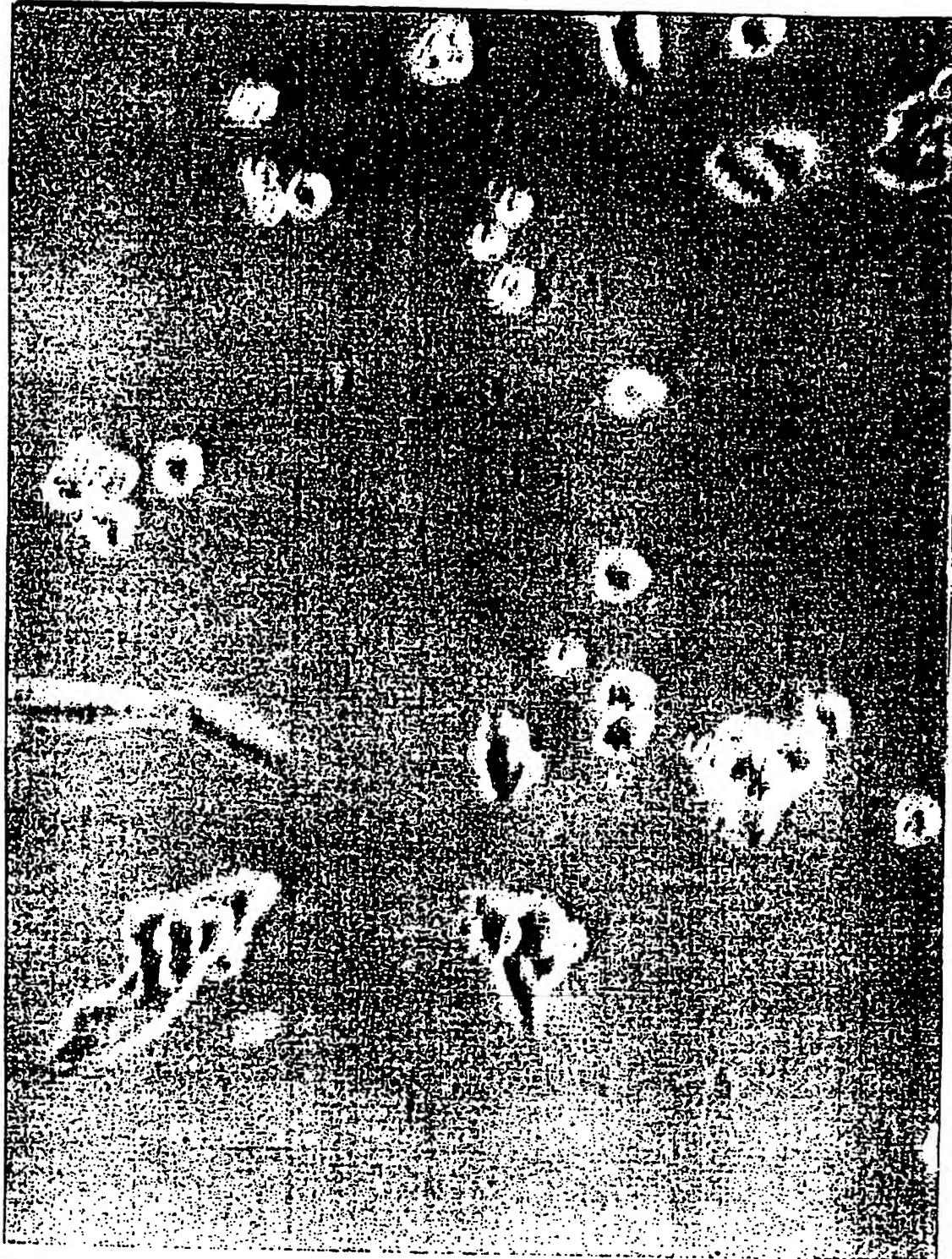
15. Verwendung gemäss einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Kulturmedium FMX 8 ist.

16. Verfahren zum Züchten von Tierzellen in
15 serumfreiem und insbesonders in serum- und proteinfreiem Medium, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in ein Kulturgefäß transferiert werden, welches ein Kulturmedium gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält, und dass sie bei nachfolgenden Verdünnungsstufen ebenfalls in Kul-
20 turgefässe, enthaltend ein Kulturmedium gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6, weitertransferiert werden.

17. Verwendung von FMX 8 zur adhärenten Kul-
tivierung von Baby Hamster Kidney Zellen.

Bild 1:

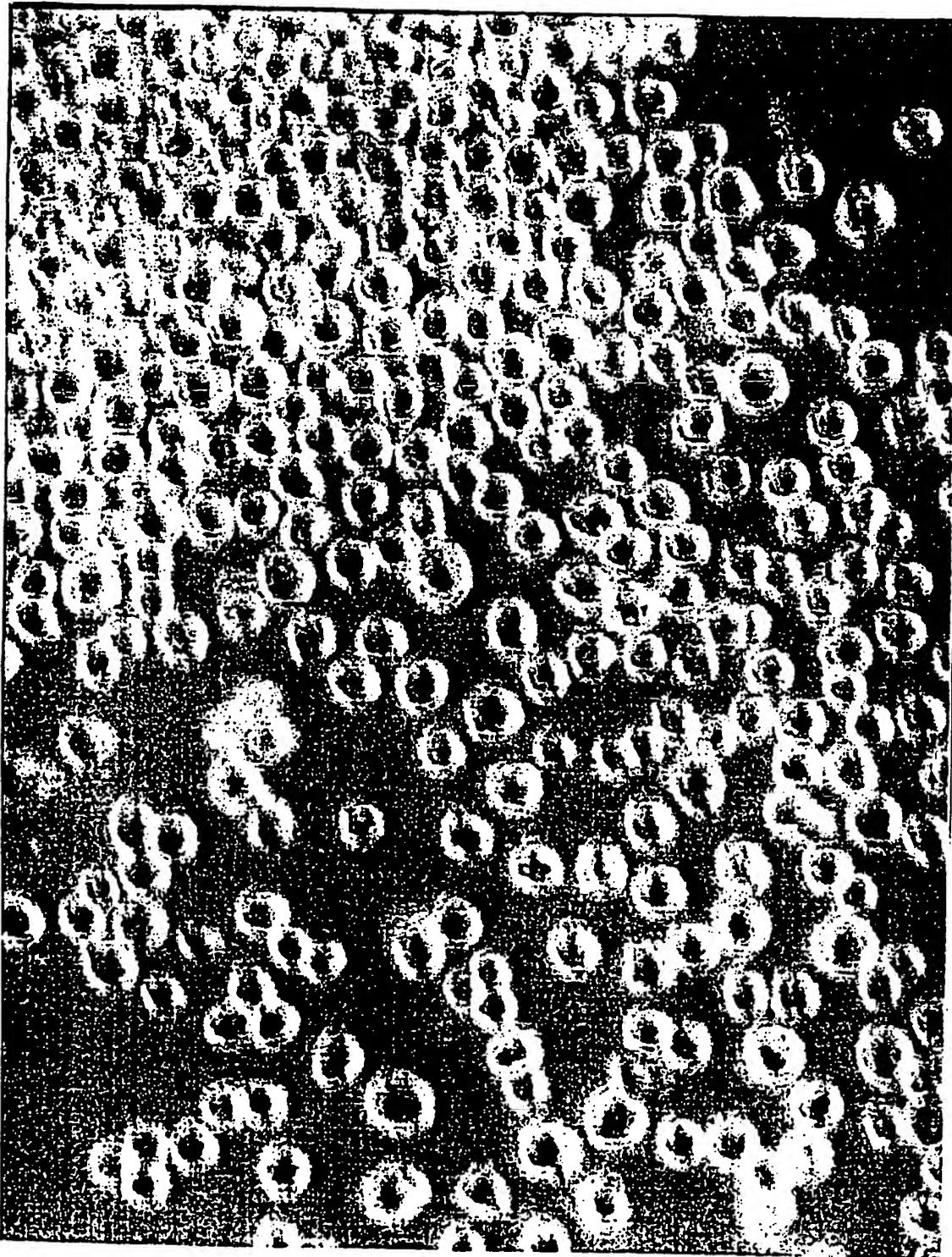
1/9



ERSATZBLATT

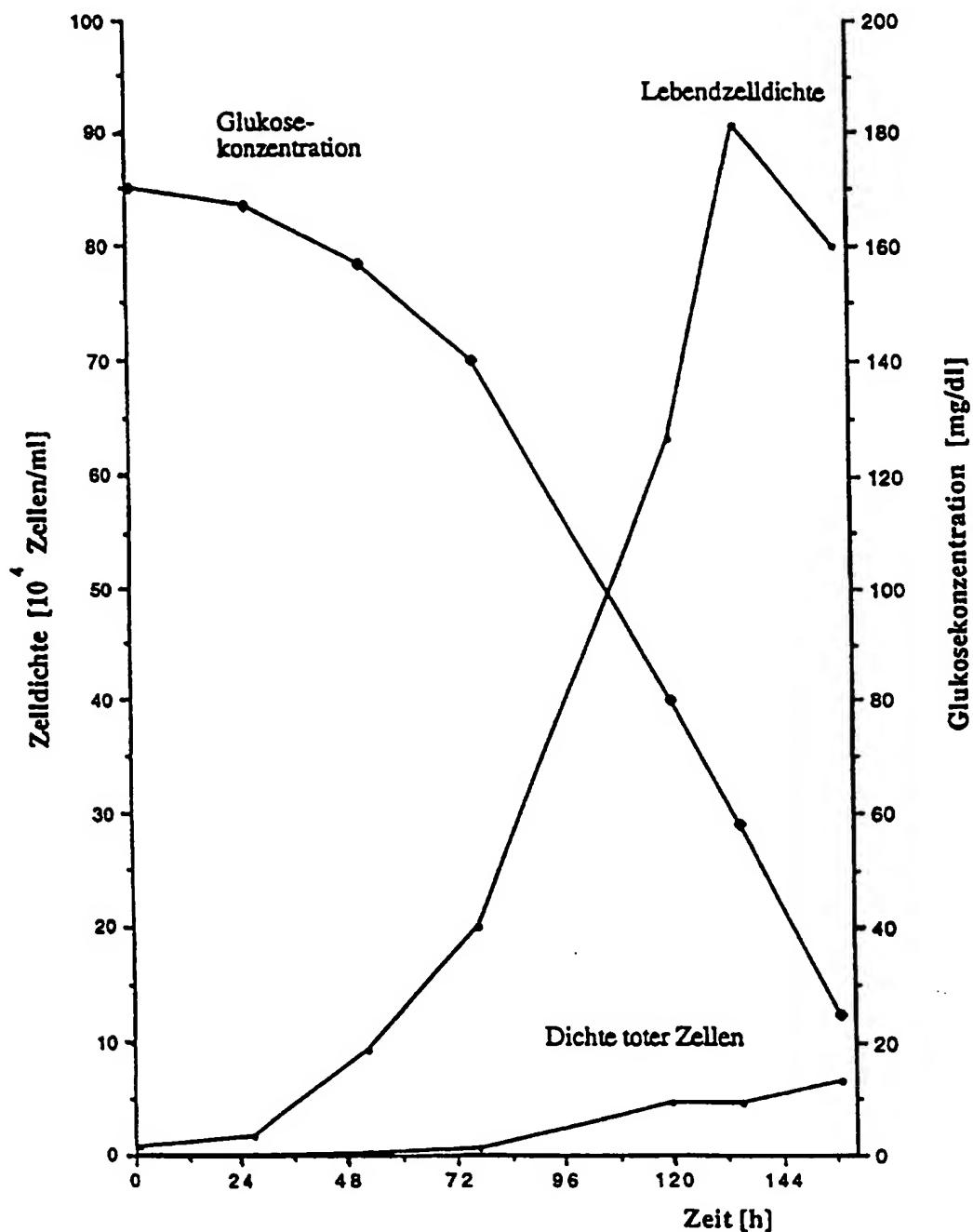
2/9

Bild 2:



3/9

Figur 3:



Medium: FMX 8 + 0.5 mg/ml Suramin Natrium + 3 mg/ml HEPES

Temperatur: 37°C

rpm: 40

Atmosphäre: 5% Kohlendioxid in Luft

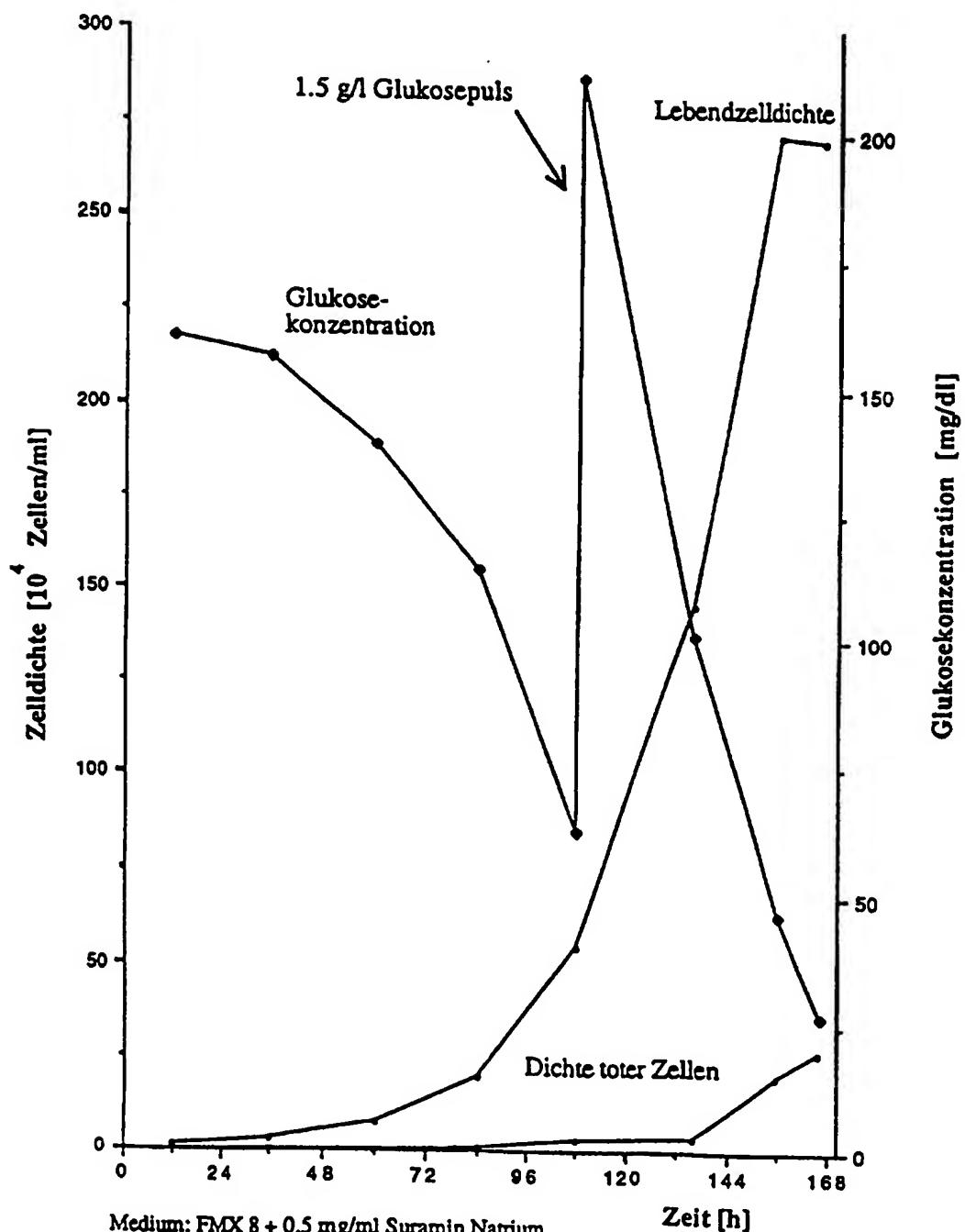
 $\mu_{\text{max}}=0.87 / \text{d}$ (Verdopplungszeit = 19 h)

Max. Zelldichte: 900'000 Zellen/ml

ERSATZBLATT

4/9

Figur 4:



Medium: FMX 8 + 0.5 mg/ml Suramin Natrium

Arbeitsvolumen: 2.3 l

Temperatur: 37°C

rpm: 580

pH: 7.3

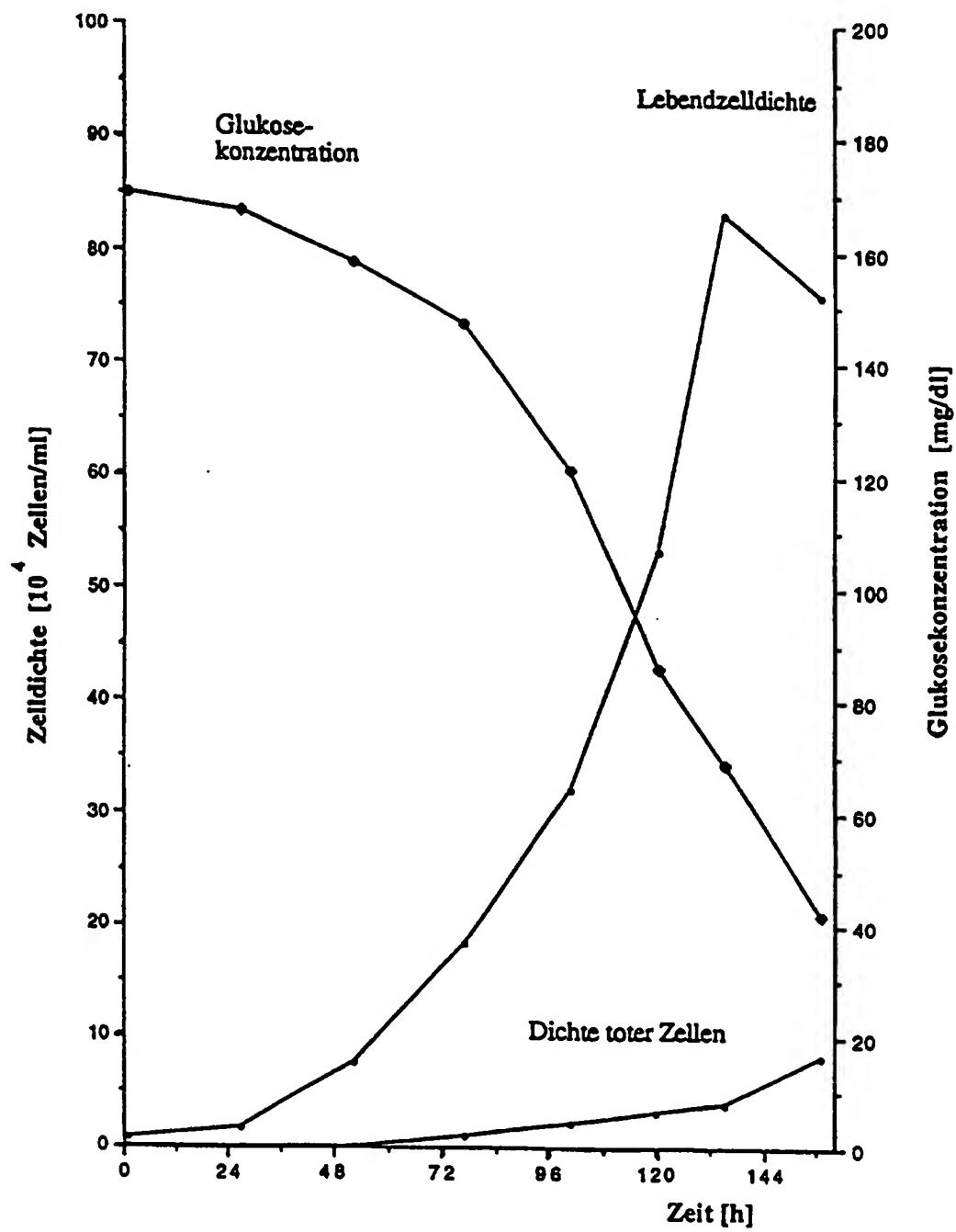
pO₂: 50% Luftsauerstoffsättigung $\mu_{\text{max}} = 1.05 / \text{d}$ (Verdopplungszeit = 15.8 h)

Max. Zelldichte: 2'700'000 Zellen/ml

ERSATZBLATT

5/9

Figur 5:



Medium: FMX 8 + 0.5 mg/ml Suramin Natrium + 3 mg/ml HEPES

Temperatur: 37°C

rpm: 40

Atmosphäre: 5% Kohlendioxid in Luft

 $\mu_{\text{max}}=0.85 / \text{d}$ (Verdopplungszeit = 19.5 h)

Max. Zelldichte: 830'000 Zellen/ml

ERSATZBLATT

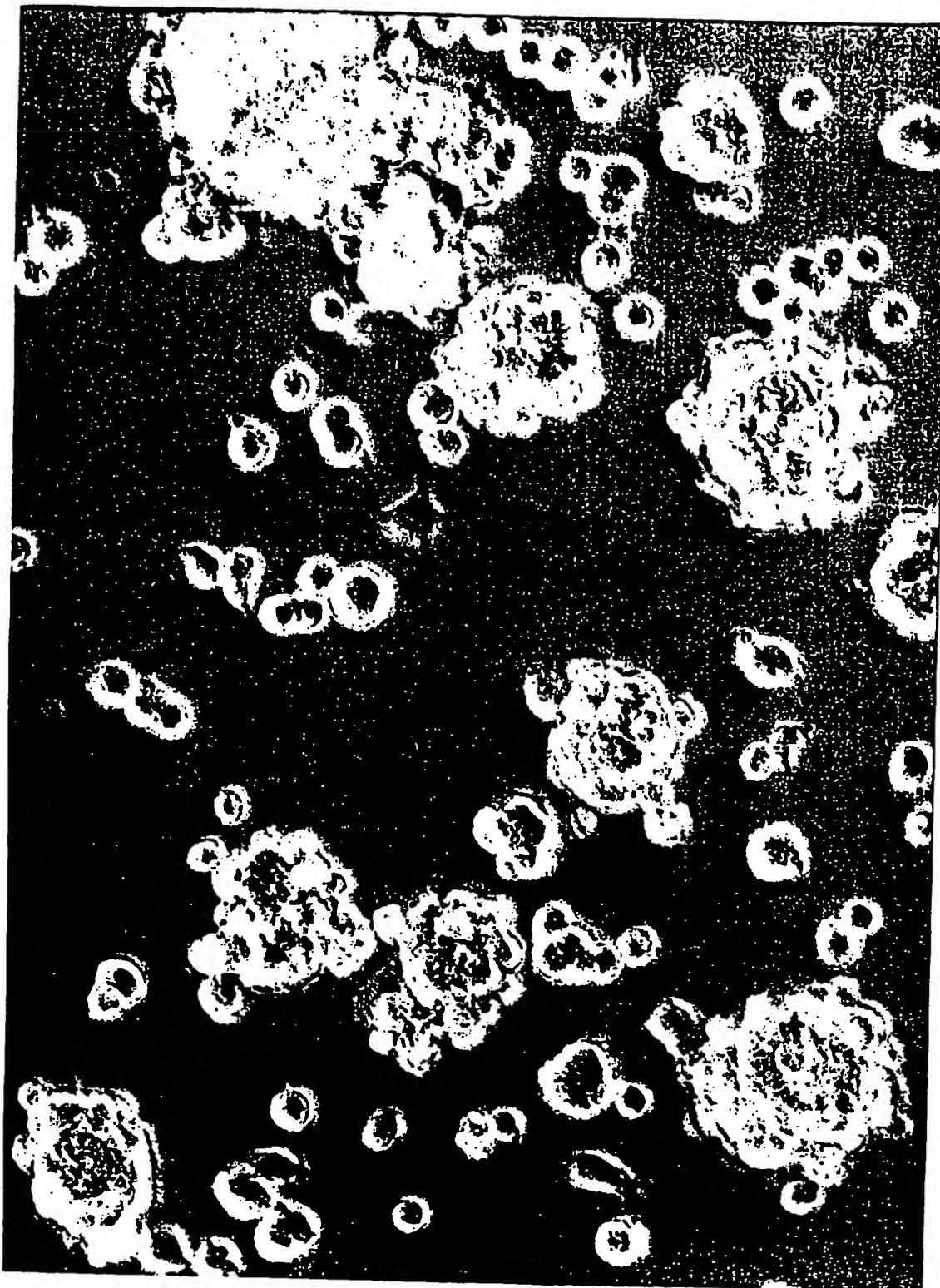
Bild 6:

6/9



Bild 7:

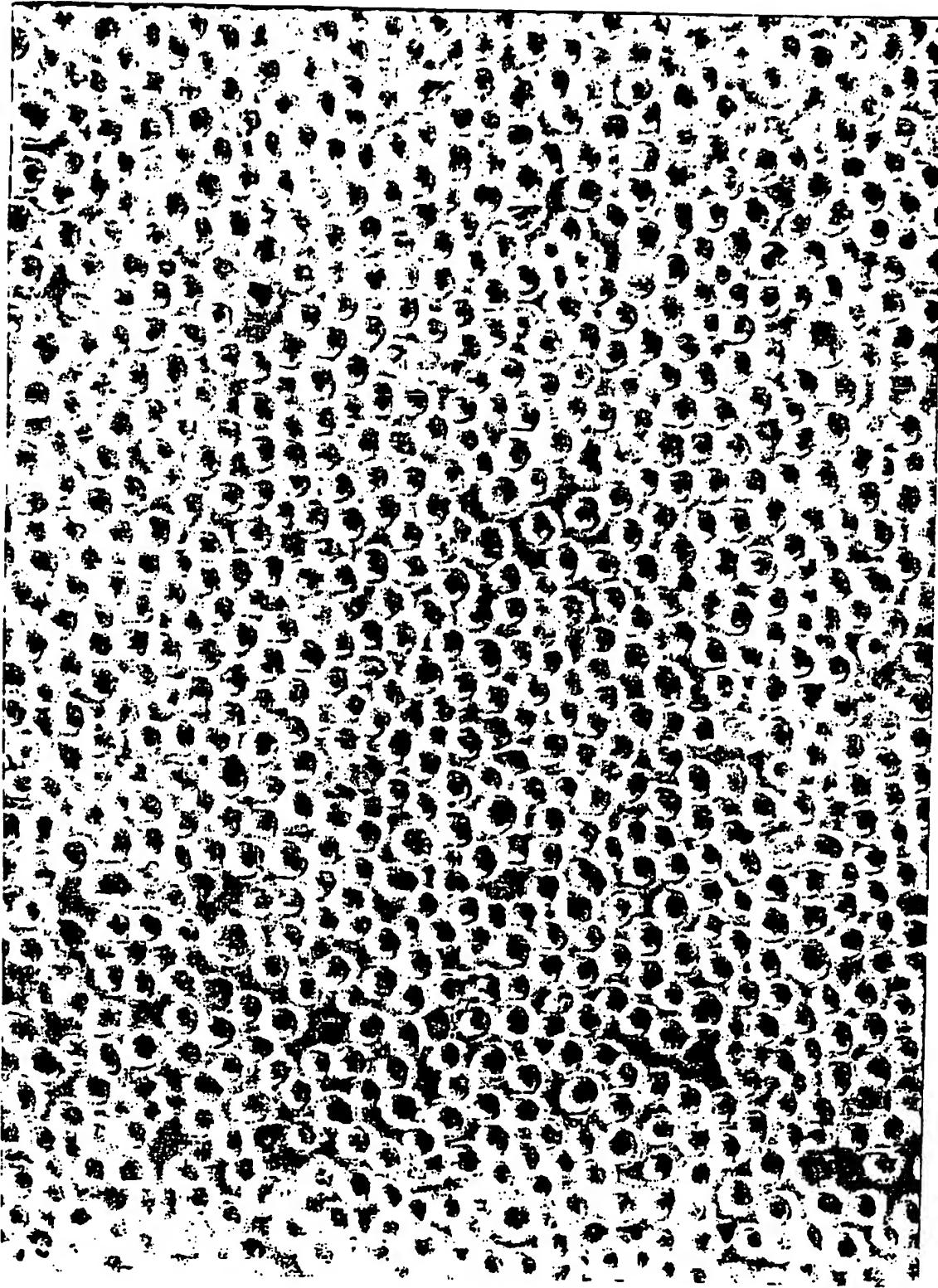
7/9



ERSATZBLATT

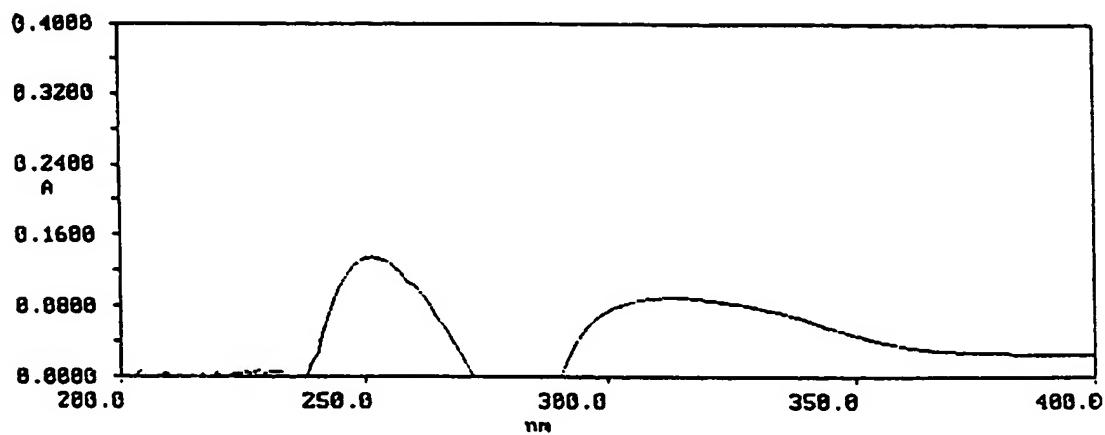
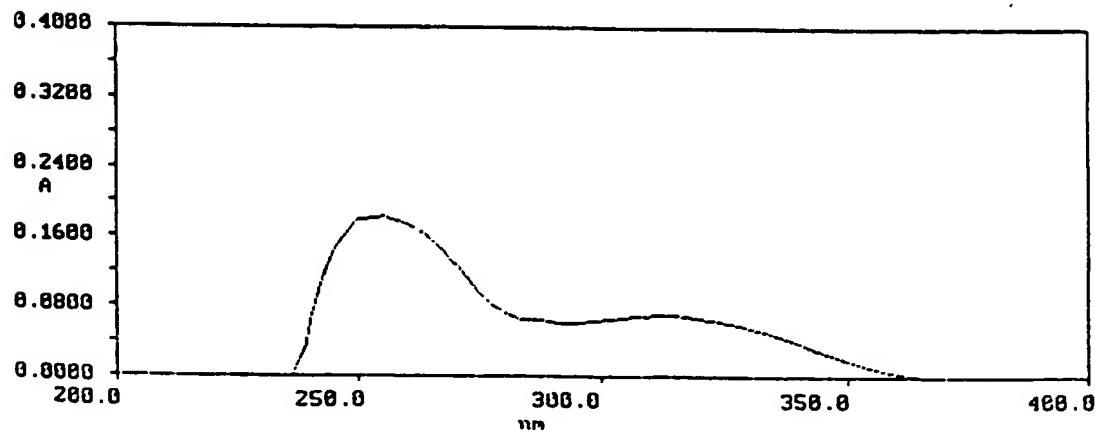
8/9

Bild 8:



ERSATZBLATT

9 / 9

Figur 9:**Figur 10:****ERSATZBLATT**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 5/00, 5/06		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/07730 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. März 1996 (14.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH95/00191		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. September 1995 (05.09.95)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 2763/94-9 9. September 1994 (09.09.94) CH		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 18. April 1996 (18.04.96)	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: RENNER, Wolfgang, A. [CH/CH]; Im Marcoup 2, CH-3286 Muntelier (CH). EPPENBERGER, Hans, M. [CH/CH]; Wiesenweg 5, CH-8116 Würenlos (CH). BAILEY, James, Edwin [US/CH]; Winkelwiese 6, CH-8001 Zürich (CH).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BAILEY, James, Edwin; Institut für Biotechnologie, ETH Zürich, CH-8093 Zürich (CH).			

(54) Title: **CHEMICAL PROCESS FOR PROMOTING THE PROLIFERATION OF ANIMAL CELLS**

(54) Bezeichnung: **CHEMISCHES VERFAHREN ZUR FÖRDERUNG DER PROLIFERATION VON TIERISCHEN ZELLEN**

(57) Abstract

The invention relates to means and a process for the serumless and proteinless proliferation of animal cells in cell cultures and the use of suramine-like compounds, especially suramine, as an additive for serumless and proteinless culture media.

(57) Zusammenfassung

Es werden Mittel und Verfahren zur serum- und proteinfreien Proliferation von Tierzellen in Zellkulturen sowie die Verwendung von suraminähnlichen Verbindungen, insbesondere Suramin als Zusatz zu serum- und proteinfreien Kulturmedien beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BP	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CH 95/00191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/00 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SURGERY TODAY, vol. 24, no. 3, 1994 pages 234-240. HIDENORI MUKAIDA ET AL. 'THE INHIBITORY EFFECT CAUSED BY SURAMIN ON THE PARACRINE GROWTH OF HUMAN CANCER CELLS AND FIBROBLASTS.' see the whole document ---	1
Y	JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 134, 1992 pages 505-511. K. TRIEB ET AL. 'SURAMIN AFFECTS DIFFERENTIATED AND UNDIFFERENTIATED HUMAN THYROID EPITHELIAL CELLS IN VITRO.' see the whole document -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'B' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *'A' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 February 1996	Date of mailing of the international search report 29.02.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentam 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Rempp, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Patentamt
PCT/CH 95/00191

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N5/00 C12N5/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK:

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SURGERY TODAY, Bd. 24, Nr. 3, 1994 Seiten 234-240, HIDENORI MUKAIDA ET AL. 'THE INHIBITORY EFFECT CAUSED BY SURAMIN ON THE PARACRINE GROWTH OF HUMAN CANCER CELLS AND FIBROBLASTS.' siehe das ganze Dokument ---	1
Y	JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, Bd. 134, 1992 Seiten 505-511, K. TRIEB ET AL. 'SURAMIN AFFECTS DIFFERENTIATED AND UNDIFFERENTIATED HUMAN THYROID EPITHELIAL CELLS IN VITRO.' siehe das ganze Dokument -----	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'B' Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine minderliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipiels oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'A' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum der Abschluss der internationalen Recherche

Abschlußdatum der internationalen Recherchenberichte

13. Februar 1996

29.02.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentamt 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Belehrer

Rempp, G